

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



28/1-
BR 00/00068

01 AUG 2000

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

BR 00/00068

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL


7 JU

CÓPIA OFICIAL

PARA EFEITO DE REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

O documento anexo é a cópia fiel de um
Pedido de Patente de Invenção
Regularmente depositado no Instituto
Nacional da Propriedade Industrial, sob o
número PI 9903137-0 de 22/06/1999.

Rio de Janeiro, em 14 Julho de 2000.


Glória Regina Costa
Chefe do NUCAD



9903137

Protocolo

Número (21)

Adicional em 1/2
Mat. 0449

(Uso exclusivo do INPI)

DEPÓSITO

Pedido de Patente ou de
Certificado de Adição

depósito / /

Espaço reservado para etiqueta (número e data de depósito)

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNP

1.2 Qualificação: Fundação Pública 1.3 CGC/CPF: 33.654.831/0001-36

1.4 Endereço completo: Av. W 3 Norte, Quadra 507/B, Brasília CEP 70.741-901
Distrito Federal

1.5 Telefone: (061) 348-9500

FAX: (061) 348-9513

() continua em folha anexa

2. Natureza:

☒ 2.1 Invenção

☐ 2.1.1. Certificado de Adição

☐ 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: INVENÇÃO

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

" SÍNTESE DE UM NOVO DERIVADO DE AMINOÁCIDO PARAMAGNÉTICO (EPM-5) PARA USO EM MARCAÇÃO DE DIFERENTES MACROMOLÉCULAS E SISTEMAS DE INTERESSE QUÍMICO-BIOLÓGICO "

() continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão do pedido nº. _____, de ____/____/____.

5. Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade:

Nº de depósito _____ Data de Depósito ____/____/____ (66)

6. Prioridade - o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

Pais ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

() continua em folha anexa

7. **Inventor (72):**
() Assina aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s):
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

7.1 Nome: CLÓVIS RYUICHI NAKAIE

7.2 Qualificação: brasileiro, professor universitário, casado, CPF 496159478-4

7.3 Endereço: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Departamento de Biofísica, Rua 3 de maio 100, São Paulo, Capital

7.4 CEP: 04044-020

7.5 Telefone (011) 575-9617

() continua em folha anexa

8. **Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**

() em anexo
9. **Declaração de divulgação anterior não prejudicial** (Período de graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo nº 127/97):

() em anexo
10. **Procurador (74):**

10.1 Nome e CPF/CGC: EURY PEREIRA LUNA FILHO
CPF 538882357-15

10.2 Endereço: Av. W 3 Norte, Quadra 507/B, SEPN, 4º, PROJUR

10.3 CEP: 70.741-901

10.4 Telefone (061) 348-9500

11. **Documentos anexados** (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de recolhimento	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2 Procuração	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	8 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1 fls.
<input type="checkbox"/>	11.9 Outros (especificar):				fls.
<input type="checkbox"/>	11.10 Total de folhas anexadas:				fls;

12. **Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras**

Brasília, DF, de junho de 1999
Local e Data

Eury Pereira Luna Filho - OAB-DF 989-A

Assinatura e Carimbo:
Eury Pereira Luna Filho Adv.
Advogado - PROJUR

**FOLHA ANEXA AO PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO PARA
"SÍNTESE DE UM NOVO DERIVADO DE AMINOÁCIDO PARAMAGNÉTICO
(EPM-5) PARA USO EM MARCAÇÃO DE DIFERENTES MACROMOLÉCULAS
E SISTEMAS DE INTERESSE QUÍMICO-BIOLÓGICO"**

7.- INVENTOR (es):

MINEKO TOMINAGA, professora aposentada do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), CPF 014564238-00, Rua Tabapuã 452, apto. 102, CEP 045333-001, São Paulo Capital;

ANTONIO CECHELLI DE MATTOS PAIVA, brasileiro, professor universitário, casado, CPF 002089498-87, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Departamento de Biofísica;

SIMONE DOS REIS BARBOSA, brasileira, química, solteira, CPF 195123538-41, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Departamento de Biofísica - Rua 3 de maio 100, CEP 04044-020, São Paulo, Capital;

REINALDO MARCHETTO, brasileiro, professor universitário, CPF 046665288-73, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química - Instituto de Química - Caixa Postal 355, CEP 14801-970, Araraquara, São Paulo;

SHIRLEY SCHREIER, brasileira, professora universitária, divorciada, CPF 698708458-00, Universidade de São Paulo (USP) - Departamento de Bioquímica - Instituto de Química - Caixa Postal 26077, CEP 05599-970, São Paulo, Capital

"SÍNTESE DE UM NOVO DERIVADO DE AMINOÁCIDO PARAMAGNÉTICO (EPM-5) PARA USO EM MARCAÇÃO DE DIFERENTES MACROMOLÉCULAS E SISTEMAS DE INTERESSE QUÍMICO-BIOLÓGICO"

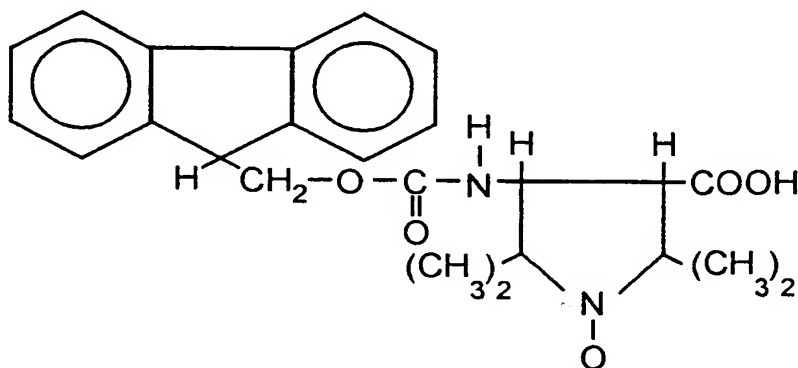
5 Esta invenção se refere à síntese química de um novo derivado paramagnético do tipo β -aminoácido contendo um radical nitróxido em um anel pirrolidínico, e cujo amino grupo se encontra acilado com o grupamento removível em meio básico denominado 9-fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc). Este derivado paramagnético é portanto
10 um novo composto do tipo marcador de spin (ou *spin label*) e poderá ser utilizado como nova molécula-repórter na marcação de seqüências peptídicas e de outras macromoléculas e sistemas onde se pode aplicar o método da ressonância paramagnética eletrônica (RPE). O seu emprego pode se estender para outras espectroscopias como a de fluorescência ou
15 a de ressonância nuclear magnética pois o caráter paramagnético deste composto pode afetar os resultados espectrais destas metodologias. De um modo mais amplo, por conter tanto grupamentos amínicos quanto carboxílicos reativos, este novo composto orgânico poderá ser ligado em moléculas ou determinados sistemas onde há a possibilidade de ligação
20 com estes dois grupamentos funcionais.

Em termos de estrutura química, a base deste novo derivado químico é o ácido 2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxil-3-amino-4-carboxílico que passaremos a denominar Poac e que teve a sua síntese já reportada há mais de duas décadas (*v. g.* Tetrahedron 491-499 [1965] e Bull. Soc. Chim.
25 France, 3, 815-817 [1967]).

O composto inédito de que trata a presente patente é o seu derivado bloqueado em seu amino grupo pelo grupamento Fmoc acima mencionado,

originando o marcador de spin **Fmoc-Poac** [ácido 2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-3-(9-fluorenilmetiloxycarbonil)-amino-4-carboxílico].

É através deste derivado que se irá conseguir a inserção do composto Poac como se fosse um aminoácido ligado em uma determinada seqüência peptídica. A abreviação química **Fmoc-Poac** será portanto utilizada neste relatório descritivo, e a denominação que também lhe será dada será **EPM-5**. A estrutura química do Fmoc-Poac (ou EPM-5) é representada abaixo:



Estrutura química do marcador de spin Fmoc-Poac

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE), (*v.g.* Biological Magnetic Resonance, Berliner, L.J. e Reuben, J., eds, Plenum Publishing, New York, [1989]), é um método espectroscópico atualmente muito importante pois permite o estudo de macromoléculas ou sistemas marcados paramagneticamente obtendo-se informações quanto às suas conformações, mobilidade, interações inter- ou intra-moleculares, estado de estruturação, etc.

Alcance amplo para esta técnica é mencionado na literatura (*v.g.* Free Nitroxyl Radical, Rozantsev, E. G., Ulrich, H., ed., Plenum Press, London, 1970), sendo reconhecidos diversos tipos de marcadores de spin, vale dizer, compostos que possuem paramagnetismo devido à presença de um elétron desemparelhado em algum ponto de sua estrutura. É, portanto,

uma molécula do tipo radical livre, embora necessariamente estável para poder ser empregada em temperaturas normais e pH fisiológicos, e ser submetida, ainda, a diversas reações químicas ou experimentos sem que o grupamento radical livre da molécula reaja.

5 Dentre os marcadores de spin mais empregados, têm-se aqueles contendo grupamento nitróxido onde se localiza o elétron desemparelhado. E é com esta classe de spin label que mais se desenvolveu a aplicação da metodologia da RPE para a marcação de importantes estruturas biológicas como os peptídeos e proteínas. A literatura registra, há cerca de duas
10 décadas atrás, a utilização da RPE no método da síntese peptídica em fase sólida [(The Peptides: Analysis, Synthesis and Biology, 2, Academic Press, New York (1980)]. Isto foi efetuado através da utilização de um marcador de spin denominado **Toac** (ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxi-4-amino-4-carboxílico protegido com o seu amino grupo acilado pelo protetor ácido
15 lábil tert-butiloxycarbonila (Boc) (*v.g.* Braz. J. Med. Biol. Res. 14, 173 [1981] e Biochim. Biophys. Acta 742, 63 [1983]). O derivado **Boc-Toac** foi o primeiro utilizado para se inserir o marcador Toac em uma seqüência peptídica. Porém, devido a particularidades do método de síntese peptídica quando empregado o protetor Boc, a introdução do Toac era
20 unicamente possível na extremidade amino terminal da cadeia peptídica.

Para contornar esta limitação da aplicação da RPE na marcação de peptídeos, procurou-se estratégia alternativa que permitisse inserir o derivado de aminoácido Toac internamente à estrutura de qualquer peptídeo (*v.g.* J. Am. Chem. Soc. 115, 11042 [1993]).

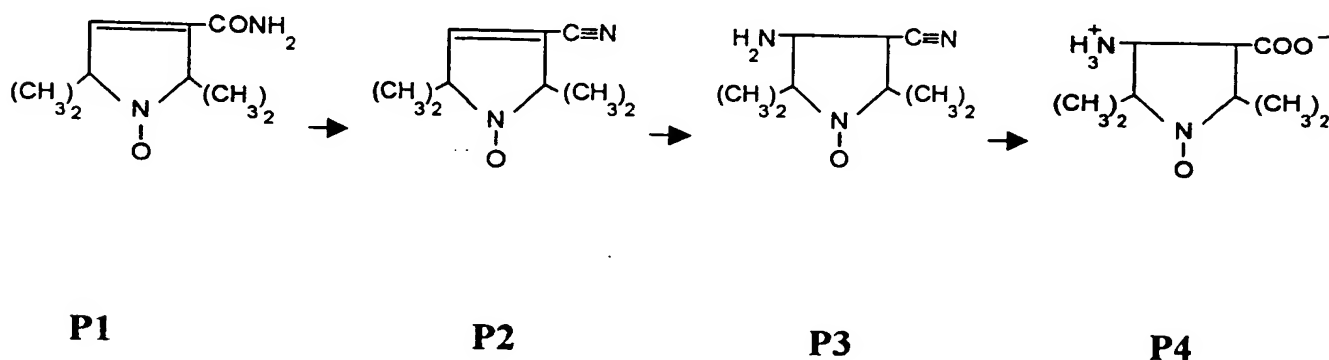
25 A aplicação da RPE na química de peptídeos passou, então, a apresentar enorme avanço, com publicações mostrando estudos conformacionais de peptídeos (*v.g.* J. Am. Chem. Soc. 117, 10555 [1995];

FEBS Lett. 375, 239 [1995]; Biopolymers 42, 821 [1997]) ou de peptidil-resinas (Tetrahedron Lett. 38, 517 [1997]). Por ser um derivado de aminoácido, o Toac foi introduzido em diferentes posições de alguns peptídeos de importância biológica, tais como a angiotensina II ou bradicinina mas houve sempre perda parcial ou total de sua potência biológica devido à introdução de um composto não natural em suas estruturas (*in* Peptides 1996, Mayflower Scientific Co. 673 [1998]).

Agora encontrou-se um hormônio peptídico marcado com um marcador de spin e que manteve integralmente a sua atividade biológica (*v.g* FEBS Lett. 446, 45 [1999]). Este resultado foi obtido com o hormônio estimulador do α -melanocito (tridecapeptídeo) e pelas suas potencialidades em inúmeros ensaios químico-biológicos (é paramagnético, naturalmente fluorescente e com atividade integral) já está submetido ao patenteamento (PI9900595, de 24 de fevereiro de 1999: " *Síntese do primeiro análogo [EPM-2] paramagnético e ativo do hormônio estimulador do melanócito contendo radical livre estável em forma de aminoácido* ")

Apesar destes resultados, uma das limitações do emprego do Toac na síntese peptídica foi a dificuldade de se acoplar o aminoácido seguinte da seqüência durante o crescimento peptídico. Isto seria devido à baixa nucleofilicidade do amino grupo deste marcador de spin, cujo pKa passa de 8 (como no caso do Toac livre) para cerca de 5,5 quando ligado na extremidade N-terminal de uma seqüência peptídica (*v.g.* Braz. J. Med. Biol. Res. 14, 173 [1981] e Biochim. Biophys. Acta. 742, 63 ([1983])). Diversos reacoplamentos e o aumento da temperatura da reação de acoplamento são, muitas vezes, necessários para a inserção integral do aminoácido subsequente da seqüência desejada (*in* J. Am. Chem. Soc. 115, 11042 [1993]).

Objetivando tanto contornar esta limitação do uso do Toac quanto encontrar um marcador de spin alternativo, que, pela sua estrutura diferenciada, passasse a induzir uma conformação diferenciada da imposta pelo Toac no peptídeo em estudo, decidiu-se sintetizar o composto **Fmoc-Poac**, seguindo as etapas sintéticas já descritas na literatura (v.g. Tetrahedron 491-499 [1965] e Bull. Soc. Chim. France, 3, 815-817 [1967]):



Etapa 1- Obtenção de 2,2,5,5-tetrametilpirrolina-1-oxi -3-ciano (P2)

Esse produto, foi obtido tratando-se o composto de partida 2,2,5,5-tetrametil-1-oxi-3-carbamidopirrolina (P1), adquirido comercialmente, com o cloreto de tosila em piridina seca. 28,7 g ($1,5 \times 10^{-1}$) de cloreto de tosila foi adicionado a 15,3 g ($8,35 \times 10^{-2}$) de P1 dissolvido em 100 mL de piridina seca e deixado à temperatura ambiente por 48 horas. Em seguida, foram adicionados 10 g de KOH dissolvido em 250 mL de água, e a mistura foi aquecida a 80°C. Após resfriamento, o produto foi extraído com éter sulfúrico e lavado com o HCl diluído, solução diluída de NaHCO_3 e água e seco sobre Na_2SO_4 . A evaporação do solvente a pressão reduzida, após filtração, forneceu 12,76 g (rendimento= 92 %) de um produto alaranjado que foi purificado em uma coluna de alumina, utilizando benzeno como eluente. O produto (P2) apresentou uma única mancha em

cromatografia em camada delgada (ccd) e as seguintes características, P.F. = 62-63 °C , M^+ = 165; Análise elementar: encontrado: C, 65,36 % , H, 7,50 % e N, 17,10 % ; teórico ($C_9 H_{13} N_2 O$) : C, 65,43 % , H, 7,93 % e N, 16,96 %).

5 Etapa 2 - Obtenção de 2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-3-amino-4-ciano (P3).

Num balão de fundo redondo de 3 L, foram colocados 600 mL de amônia líquida, 9 g de P2 ($5,44 \times 10^{-2}$) e 120 mL de água. O balão foi hermeticamente fechado para manter a mistura sob pressão e deixada à temperatura ambiente. Após 3 dias, a amônia foi eliminada, e o produto foi extraído com clorofórmio. O produto recristalizado de éter-éter de petróleo (9,37 g, rendimento = 94 %) apresentou as seguintes características : M^+ = 182; P.F. 84-85 °C; Análise elementar : (encontrado: C, 58,98%; H, 8,37 %; N, 22,21%; teórico ($C_9 H_{16} ON_3$): C, 59, 31 % ; H, 8,85 % ; N, 23,06 %).

15 Etapa 3 - Preparação de ácido 2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-3-amino-4-carboxílico (P4) - Poac ;

Num balão de fundo redondo de 3 L, foram adicionados uma mistura de 8 g ($4,38 \times 10^{-2}$ mol) de P3, 40 g de barita e 600 mL de água. O balão foi hermeticamente fechado e aquecido a 120°C por período de 90 minutos. Após resfriamento, a mistura foi neutralizada com o gelo seco em excesso e filtrado. A evaporação de solução aquosa à pressão reduzida forneceu 8 g de produto bruto (rendimento : 90%) que foi recristalizado de etanol 90%. O produto apresentou as seguintes características: P.F. = 212 °C (funde com sublimação); M^+ = 201 (Figura 2), um único pico no HPLC, (Figura 3); Análise elementar : (encontrado : C, 53,1% ; H, 8,28 %; N, 13,95 % ; Teórico ($C_9 H_{17} N_2 O_3$): C, 53,71 % ; H, 8,52; N, 13,92). Infra-vermelho (KBr) : cm^{-1} : 3084, 2872, 2792, 2548 e 2132 (NH^+_3); 1643 ν_{AS} (NH^+_3) ; 1574 (ν_{AS}

C=O); 1456 (δ CH₃); 1396 e 1376 (grupo gem-dimetil e COO⁻) 782 (δ C=O). A Figura 4A destaca o espectro de RPE do composto Pyoac em meio aquoso, pH 5,0. Os valores dos dois tempos de correlação rotacional encontrados (τ_B e τ_C) foram de $0,509 \times 10^{-10}$ s e $0,597 \times 10^{-10}$, respectivamente.

Preparação de Fmoc-Poac

201 mg (1 mmol) do composto P4 foram dissolvidos em 1,5 mL de água. À essa solução foram adicionados: 286 mg de carbonato de sódio decahidratada e 337 mg (1 mmol) de Fmoc-succidimil-carbonato dissolvido em 1,5 mL de acetona. A reação foi mantida à temperatura ambiente sob agitação e o pH mantido em torno de 9 através da adição de carbonato de sódio. Completada a reação (após 3 horas), a mistura foi diluída com 25 mL de água, gelada e acidificada com HCl 1 N (pH 2), e o produto extraído com acetato de etila. O extrato acetálico foi lavado com pequenas porções de água, seco sobre sulfato de sódio anidro, filtrado e evaporado sob pressão reduzida e forneceu 380 mg (rendimento de 90%) de um sólido que foi recristalizado 2 vezes de clorofórmio. O produto foi caracterizado através de espectrometria de massa, espectroscopia no infra vermelho, análise elementar e EPR. Características: $M^+ = 423$ (Figura 5). Análise elementar: encontrado: C, 67,9 % ; H, 6,35 %; N, 6,60 %; teórico (C₂₄H₂₇O₅N₂): C, 68,08 % ; H, 6,28 % ; N, 6,62 %; IR (KBr) cm⁻¹: 3444-3338 (banda larga OH e -CONHR); ~3030 (ν_{Ar} CH); 3000-2700 (ν_{Ar} COOH); 1723 (R-O-C-ON- e COOH); 1543 (δ_{NH} e ν_{CN}); 1450 (δ CH₃); 1235-1150 (grupo gem-dimetil). O espectro de RPE do Fmoc-Poac em meio aquoso, pH 5,0 está representado na Figura 5B e os valores de τ_B e τ_C foram, como se esperava pelo volume maior da molécula, maiores, indicando menor velocidade de rotação desta molécula se comparada ao

do Poac sozinho ($1,14 \times 10^{-10}$ s.rad⁻¹ e $1,79 \times 10^{-10}$ s.rad⁻¹, respectivamente).

Síntese de Poac⁷ - Angiotensina II

O análogo da angiotensina II marcado com o spin label Poac (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Poac-Phe) foi sintetizado na escala de 0,15 mmol, utilizando-se o método de fase sólida já citada e com alterações para possibilitar a inserção deste marcador no meio da cadeia peptídica (*in* J. Am. Chem. Soc. 115, 11042 [1993]). A resina empregada foi a de Wang (*in* J. Am. Chem. Soc. 95, 1328 [1973]) contendo o primeiro resíduo de aminoácido Fmoc-Phe (grau de substituição: 0.41mmol/g), adquirido comercialmente. Todos os acoplamentos foram realizados utilizando-se reagentes com um excesso molar de 2,5 vezes para os Fmoc- α aminoácidos e de 3 vezes para o Fmoc-Poac. Os reagentes para acoplamento utilizados foram diisopropilcarbodiimida (DIC) e hidroxibenzotriazol dissolvidos em mistura de diclorometano:dimetilformamida 1:1. As desproteções do Fmoc foram feitas, como já citado, com piperidina 20% em dimetilformamida (v/v) por 20min.

De relevante nesta síntese, observou-se que a estrutura do anel pirrolidina do Poac não dificulta o acoplamento do aminoácido seguinte da seqüência, como foi observado quando se sintetizou a Toac⁷ - All. Neste caso, necessitou-se de vários reacoplamentos e até mesmo de aumento de temperatura para que a reação se completasse. No caso do Poac isto não foi necessário, demonstrando que a reatividade do grupamento amínico deste marcador de spin é bem maior do que a do Toac, o que facilita o uso em síntese peptídica em geral.

Completada a síntese, o peptídeo foi desprotegido e clivado da resina pela ação do HF anidro contendo 10% da mistura p-cresol e dimetil sulfeto a 0°C e 1h e 30 min. O peptídeo bruto obtido após extração e liofilização (125mg), foi dissolvido em 70 ml de água e o pH da solução foi
5 acertado para 10 com hidróxido de amônio concentrado sob agitação magnética por um período de 2 h, para reverter a protonação do grupo nitróxido N-O que ocorre durante o tratamento com HF. Após liofilização, o peptídeo foi purificado por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) preparativo utilizando-se uma coluna de fase reversa C₁₈ (25x250mm) e
10 como eluente A, acetato de amônio 0.02M, pH 5.0; e B, acetonitrila 60% em água. Gradiente linear de 20-65% B em 135 min.

A homogeneidade do peptídeo foi confirmada através de HPLC analítico (Figura 6), espectrometria de massa, $M^+ = 1132.55$ (Figura 7) e a análise de aminoácidos apresentou a seguinte composição: Asp 0.95
15 (1.00); Val 0.96 (1.00); Ile 1.20 (1.00); Tyr 1.02 (1.00); Phe 1.00 (1.00); His 0.96 (1.00); Arg 1.02 (1.00). A Figura 8 mostra os espectros de RPE da Poac⁷-All em solução 0,25 mM do peptídeo em solução aquosa, pH 3, 6 e 9.

Não se observaram, para este análogo paramagnético da All,
20 diferenças significativas dos valores de tempo de correlação rotacional em função do pH, sugerindo, portanto, constância da conformação deste peptídeo em função do pH.

REIVINDICAÇÕES

1ª) "Síntese de um novo derivado de aminácido paramagnético (EPM-5) para uso em marcação de diferentes macromoléculas e sistemas de interesse químico-biológico" , a partir de etapas
5 sintéticas iniciais com a obtenção dos intermediários (a) 2,2,5,5-tetreametilpirrolina-1-oxi-3-ciano; (b) 2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxi-3-amino-4-ciano; e (c) 2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-3-amainao-4-carboxílico (Poac), caracterizado por obter-se o derivado paramagnético do tipo β -aminoácido, 2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-3-
10 amino-4-carboxílico, denominado Fmoc-Poac (ou EPM-5), por meio da introdução do grupamento protetor 9-fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc) no amino grupo do composto 2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-3-amino-4-carboxílico (Poac).

2ª) "Síntese de um novo derivado de aminácido paramagnético
15 (EPM-5) para uso em marcação de diferentes macromoléculas e sistemas de interesse químico-biológico", de acordo com a Reivindicação 1 acima, caracterizado pelo fato do derivado Fmoc-Poac poder ser ligado por seu grupamento carboxílico livre em macromoléculas ou sistemas, independentemente de sua utilização ou
20 não para estudos posteriores pelo método da Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).

3ª) "Síntese de um novo derivado de aminácido paramagnético (EPM-5) para uso em marcação de diferentes macromoléculas e sistemas de interesse químico-biológico", de acordo com as
25 reivindicações anteriores, caracterizado por, após a ligação do composto Fmoc-Poac em alguma molécula ou estrutura, poder se

remover o grupamento Fmoc em meio básico, possibilitando a reação do grupamento amínico do Poac que se torna livre com diferentes derivados químicos.

;

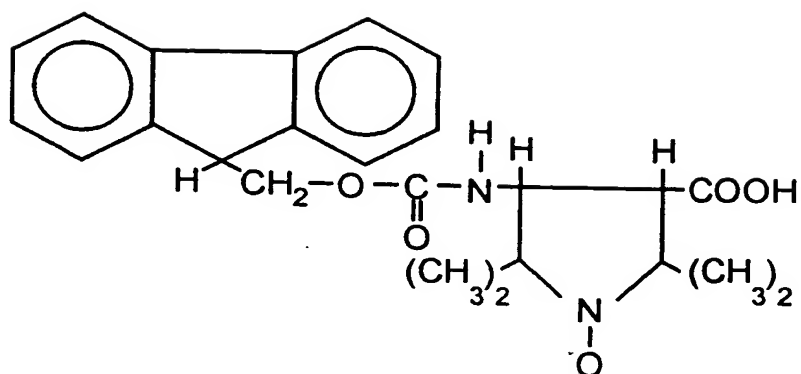


Figura 1: Estrutura química do marcador de spin Fmoc-Poac
;

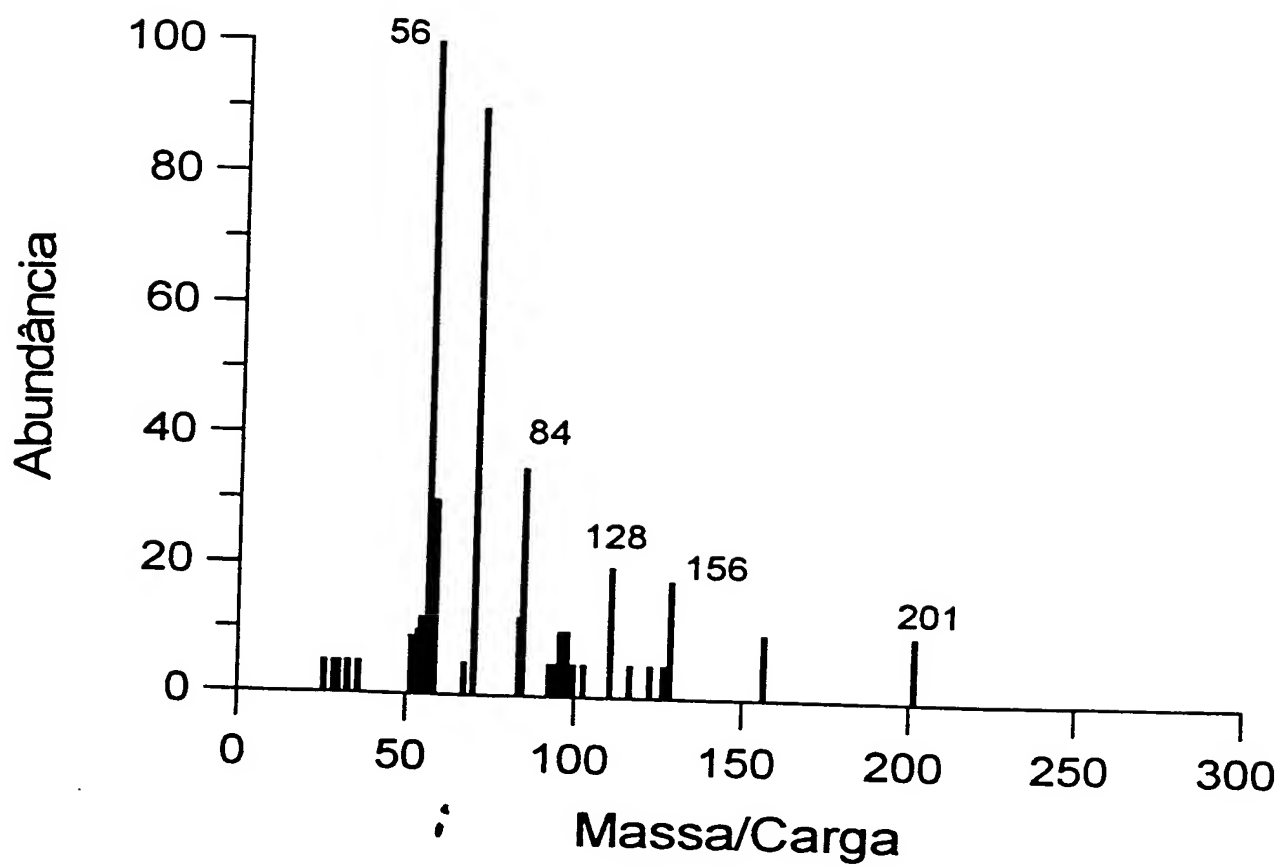


Figura 2: Espectro de massa do ácido 2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxi-3-amino-4-carboxílico (Poac).

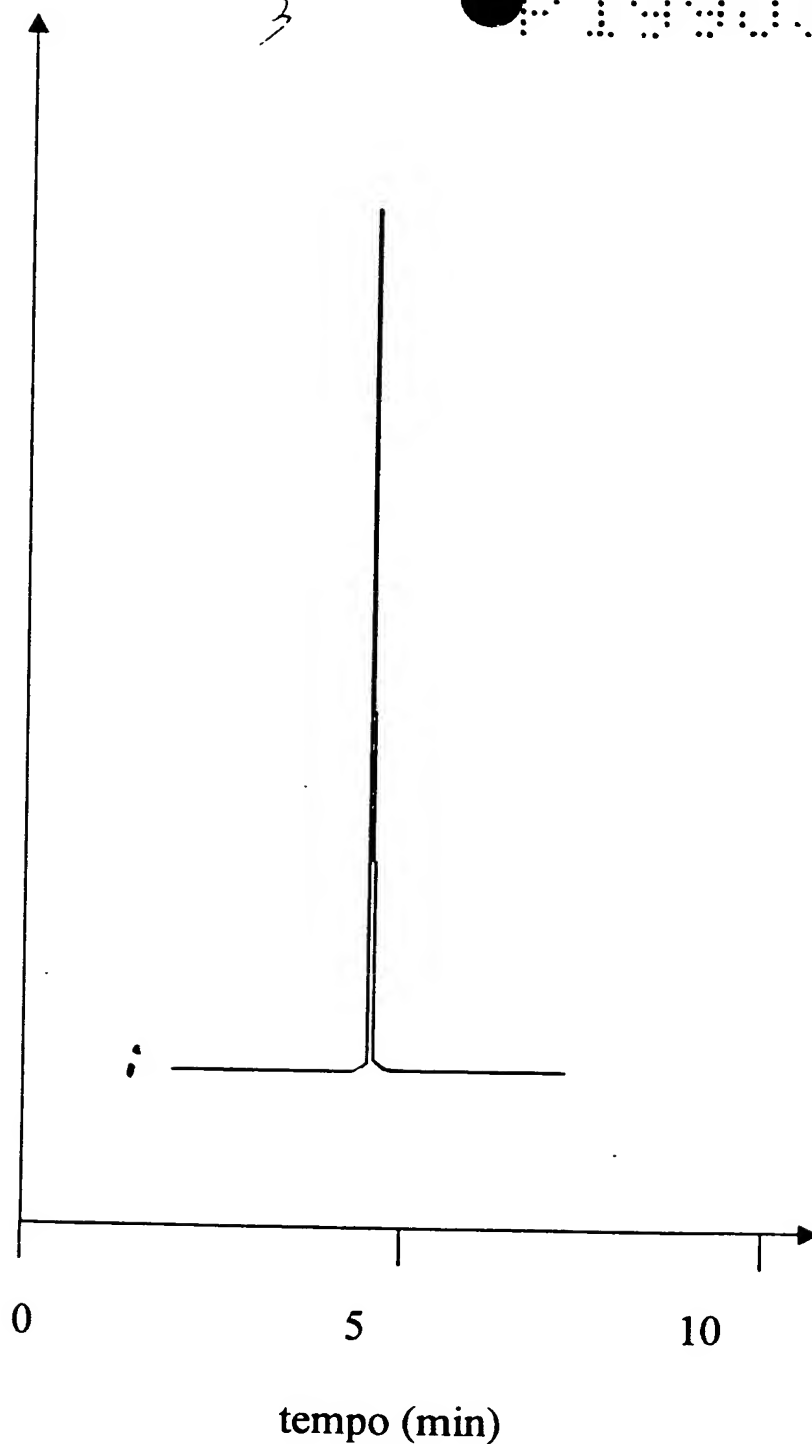


Figura 3: Perfil cromatográfico em HPLC do ácido 2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxi-3-amino-4-carboxílico (Poac). Condições experimentais: coluna C₈ (4,6 x 150 mm). Eluente A: NaH₂PO₄ 0,1M em água e, B: acetonitrila 90 / em solução aquosa ; 1-21 / de B em 10 min.

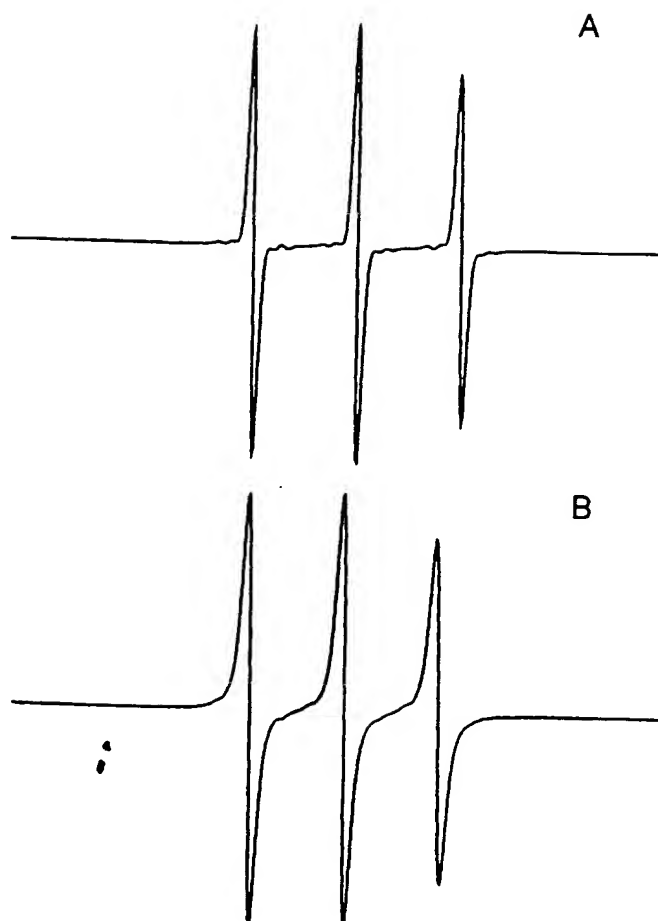


Figura 4: Espectro de RPE de 1×10^{-4} M de (A) Poac em meio aquoso (pH=5.0) e (B) Fmoc - Poac em DMF.

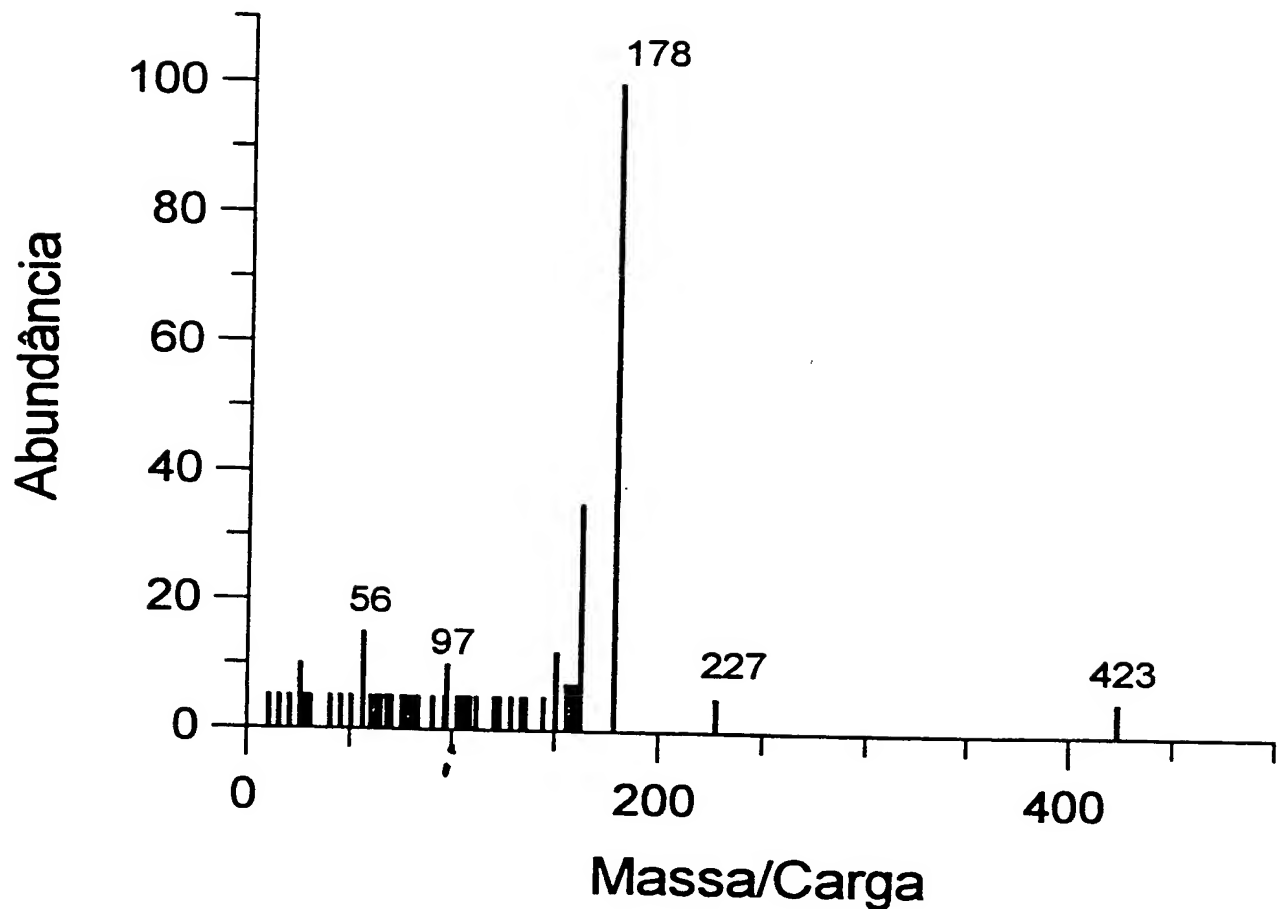


Figura 5: Espectro de massa do Fmoc- Poac.

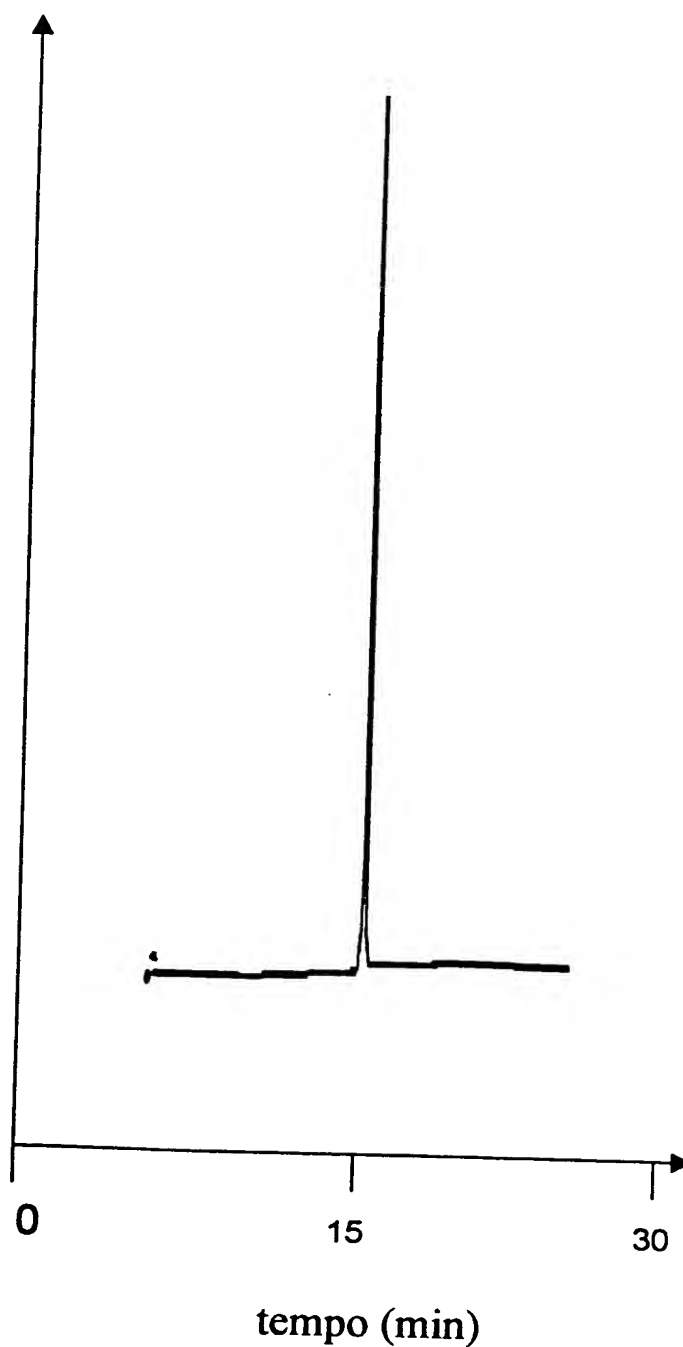


Figura 6: Perfil cromatográfico em HPLC da Poac⁷-AII. Condições experimentais: coluna C₈ (4,6 x 150 mm). Eluente A: TFA 0,1% em água e, B: acetonitrila 60% em solução aquosa de TFA 0,1%;

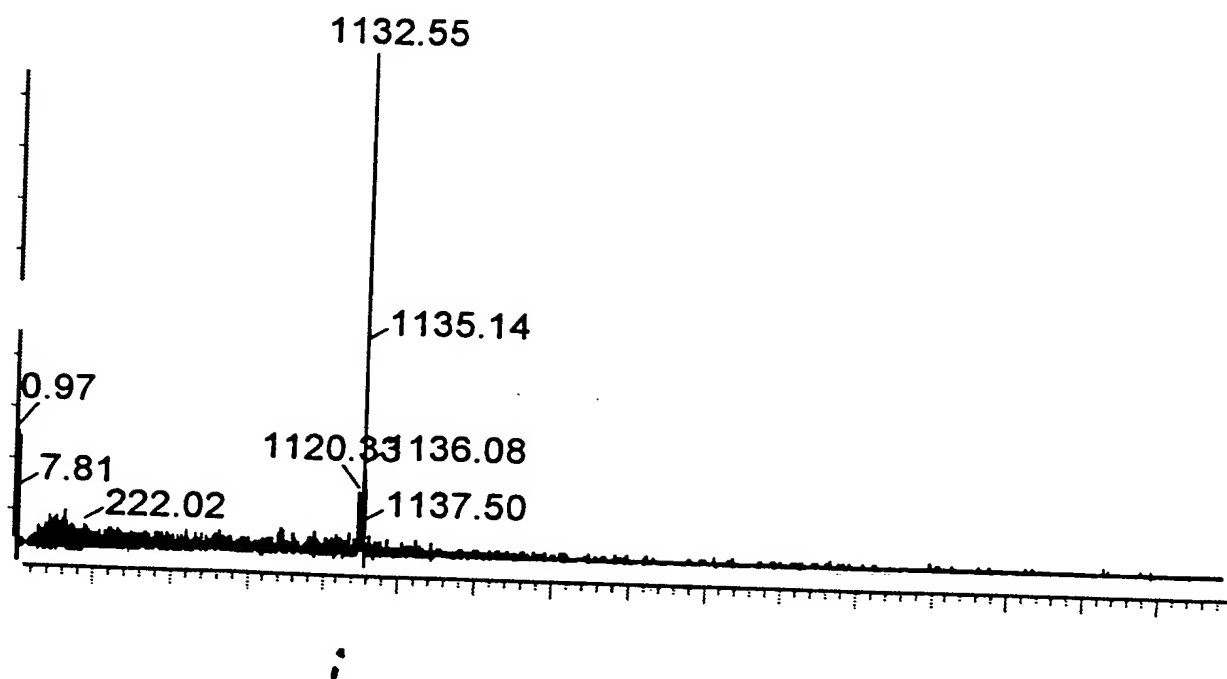


Figura 7: Espectro de massa de Poac⁷-Angiotensina II.

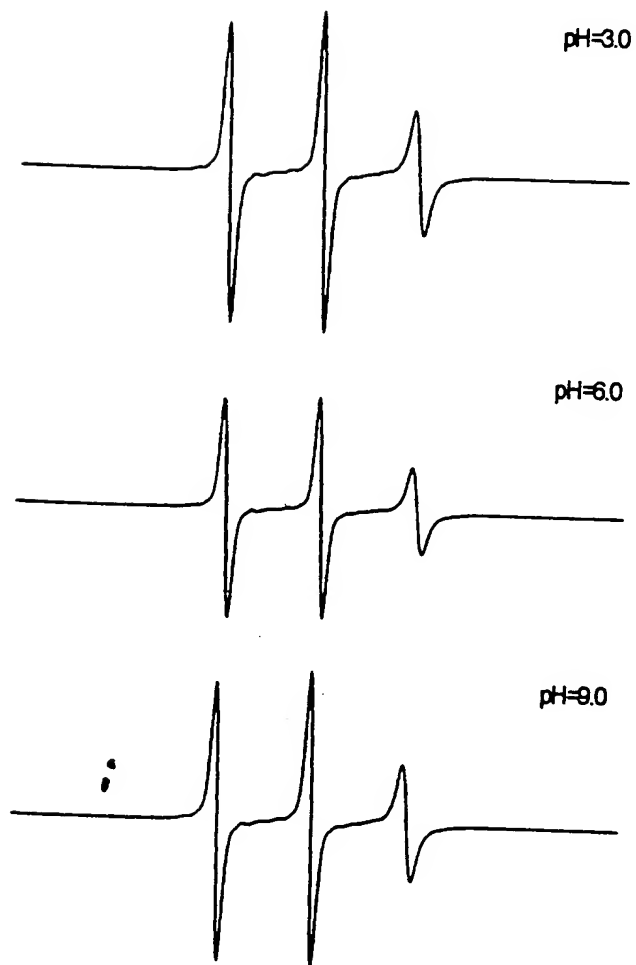


Figura 8: Espectro de RPE de 2.5×10^{-4} M de POAC⁷ - AII em pH 3, 6 e 9.

RESUMO

**"SÍNTESE DE UM NOVO DERIVADO DE AMINOÁCIDO
PARAMAGNÉTICO (EPM-5) PARA USO EM MARCAÇÃO DE
DIFERENTES MACROMOLÉCULAS E SISTEMAS DE INTERESSE
QUÍMICO-BIOLÓGICO"**

A presente invenção se refere à síntese química e à aplicação como composto orgânico paramagnético do tipo marcador de spin, do produto denominado ácido 2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxi-3-[N-(fluorenilmetiloxycarbonil)-amino-4-carboxílico, abreviado como Fmoc-Poac, e que poderá ser utilizado para ligação às extremidades amínicas de seqüências peptídicas ou de determinados sistemas. Possibilita-se, ainda, a ligação do composto apenas pelo seu radical Poac, com a remoção do protetor Fmoc, em meio básico orgânico, e, da mesma forma, quando se deseje prolongar a seqüência peptídica até o ponto desejado. Por conter um anel do tipo pirrolidina, a sua introdução no meio de uma cadeia peptídica irá provocar conformações diferenciadas das de α -aminoácidos comuns, sendo portanto um composto valioso para se estudar a relação estrutura-atividade biológica de diversos peptídeos de importância. Pelo mesmo processo de síntese viabiliza-se o uso de Fmoc-Poac na marcação do peptídeo angiotensina II (Poac⁷-AII).